Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

Methodische Untersuchungen über die Anwendbarkeit der off-Kinetik-Messung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat am isoliert perfundierten Skelettmuskel

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Klaus-Dieter Nutz

1984

RIJKS-
LEIDEN
MUS.

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

Methodische Untersuchungen über die Anwendbarkeit der off-Kinetik-Messung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat am isoliert perfundierten Skelettmuskel

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Klaus-Dieter Nutz
1984

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Staib

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Reinauer

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Der Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex: Bedeutung und Stellung im Stoffwechsel	6
1.2	Messung der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität	9
1.3	Problemstellung	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Versuchstiere	12
2.1.2	Reagenzien, Radiochemikalien, Chemikalien für Szintillationsmessungen	11
2.1.3	Geräte	12
2.1.4.	Perfusionsmedium	12
2.2	Methoden	13
2.2.1	Operationsmethoden	13
2.2.2	Perfusionsapparatur	13
2.2.3	Validität des Modells des perfundierten Rattenhinterkörpers	16
2.2.4	^{14}C- und $^{14}CO_2$-Messung im venösen Perfusat	18
3.	Ergebnisse und Diskussion	19
3.1	Grundparameter der Methodik der off-Kinetik Messung	19

3.1.1	On- und off-Kinetik nach Infusion von 1-^{14}C-Pyruvat	19
3.1.2	Abhängigkeit der off-Kinetik vom Verteilungsraum	22
3.1.3	Einfluß der Substratkonzentration auf die PDH-Reaktion	24
3.1.4	Einfluß der Temperatur auf die PDH-Reaktion	27
3.1.5	Einfluß des energetischen Zustandes auf die PDH-Reaktion	29
3.2	Zusammenfassende Besprechung der Methodik der off-Kinetik-Messung und ihrer Grundparameter	30
3.3	Einfluß verschiedener Substrate auf die Pyruvatdecarboxylierungsrate	35
3.3.1	Einfluß von Ammoniumionen und Glutaminsäure auf die PDH-Reaktion	35
3.3.2	Einfluß von Dichloracetat auf die PDH-Reaktion	38
3.3.3	Einfluß von Acetoacetat und ß-Hydroxybutyrat auf die PDH-Reaktion	40
3.3.4	Effekt von Octanoat auf die PDH-Reaktion	42
3.4	Effekt von Arbeit auf die PDH-Reaktion	44
3.4.1	Interpretation der unter Arbeit erhobenen Meßwerte	48

3.5 Graphische Zusammenstellung der Ergebnisse 50

4. Zusammenfassung 52

5. Literaturverzeichnis 54

6. Lebenslauf 57

1. Einleitung

Die Pyruvatdehydrogenase (PDH) beim Säuger ist ein Multienzymkomplex, an dessen Aufbau drei Enzymuntereinheiten, sechs Cofaktoren sowie eine Kinase und eine Phosphatase beteiligt sind (1). Bei den drei Enzymuntereinheiten handelt es sich um die Pyruvat-Decarboxylase (EC 1.2.4.1), die Dihydrolipoyl-Transacetylase (EC 2.3.1.12) und die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3). Der Multienzymkomplex benötigt die sechs Cofaktoren: Thiaminpyrophosphat, Mg^{++}, Liponsäure, Coenzym A, FAD und NAD^+. Er ist ein strukturgebundener mitochondrialer Komplex, der zum Matrixraum des Mitochondrium ausgerichtet ist. Hier katalysiert er die Reaktion:

$$CH_3 - CO - COOH + HSCoA + NAD^+ \longrightarrow CH_3 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - SCoA + NADH+H^+ + CO_2$$

Diese oxydative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verläuft in mehreren Teilschritten (s. Abb. 1):
Pyruvat unterliegt zunächst einer von der Pyruvatdecarboxylase katalysierten Decarboxylierung. Der hierbei an Thiaminpyrophosphat gebundene "aktive Acetaldehyd" wird sodann unter Oxidation zu Acetat auf Liponsäure, die prosthetische Gruppe der Dihydrolipoyl-Transacetylase, übertragen. Hierdurch wird die Disulfidform der Dihydrolipoyl-Transacetylase reduziert. Schließ-

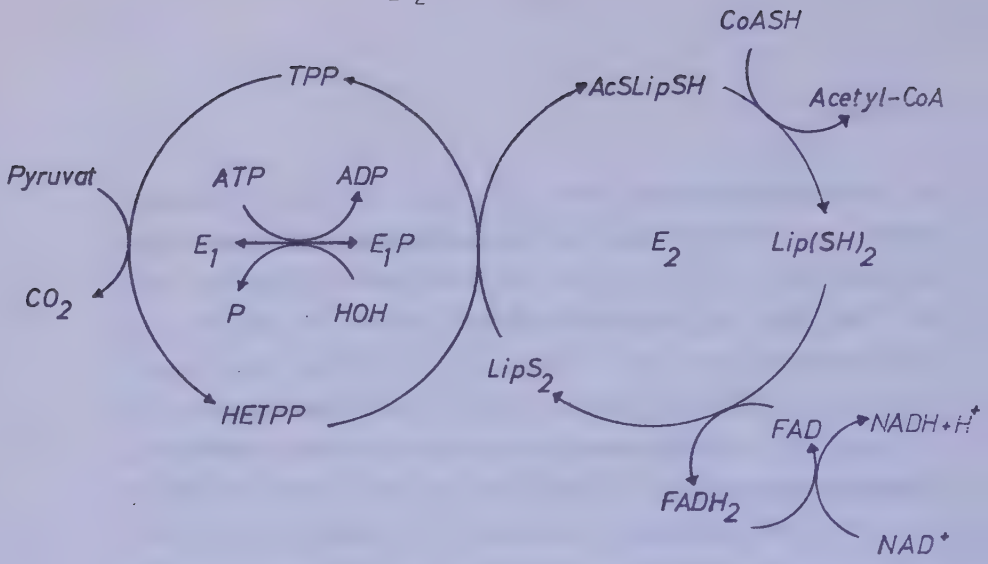


Abb. 1
Oxidation von Pyruvat durch den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex (E_1-E_2)

E_1 : Pyruvat-Decarboxylase
E_2 : Dihydrolipoyl-Transacetylase
E_3 : Dihydrolipoyl-Dehydrogenase
TPP : Thiaminpyrophosphat
HETPP : Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphat
$LipS_2$: Liponsäurerest, oxidierte Form
$Lip(SH)_2$: Liponsäurerest, reduzierte Form

lich wird der Acetyl-Rest auf CoA übertragen und das derart erhaltene Endprodukt der Reaktion freigesetzt.

In zwei Folgereaktionen wird die Dihydrolipoyl-Transacetylase reoxidiert: Im ersten Schritt wird die Liponsäure durch FAD oxidiert, das entstehende $FADH_2$ wird anschließend durch NAD^+ reoxidiert, so daß in der Bilanz NADH + H^+ entsteht. Die Übertragung des Wasserstoffs von $FADH_2$ auf NAD wird beim PDH-Multienzymkomplex durch entsprechende Redoxpotentialverschiebung durch die Proteinumgebung ermöglicht.

Der PDH-Komplex liegt als interkonvertierbares Enzym in einer aktiven oder einer inaktiven Form vor (2,3). Die aktive Form ist dephosphoryliert (PDHa), während die inaktive Form phosphoryliert ist (PDHb). Beide Formen sind über die zum PDH-Komplex gehörenden Phosphatase- und Kinase-Enzyme ineinander überführbar: Die Aktivierung erfolgt durch die PDHb-Phosphatase, die Inaktivierung unter ATP-Verbrauch durch die PDHa-Kinase.

Seit längerem sind Metabolite bekannt, die durch einen hemmenden Einfluß auf die PDHa-Kinase einen aktivierenden Einfluß auf die PDH haben: Pyruvat, Coenzym-A, NAD^+, ADP und Dichloracetat.

In umgekehrter Weise hemmen $NADH+H^+$, ATP und Acetyl-CoA die PDH durch Aktivierung der PDHa-Kinase. Die PDHb-Phosphatase läßt sich durch Mg^{++}- und Ca^{++}-Ionen stimulieren und durch $NADH+H^+$ hemmen. Einen Überblick über die Metabolite, die die Interkonvertierung des PDH-Komplexes beeinflussen, gibt Abb. 2.

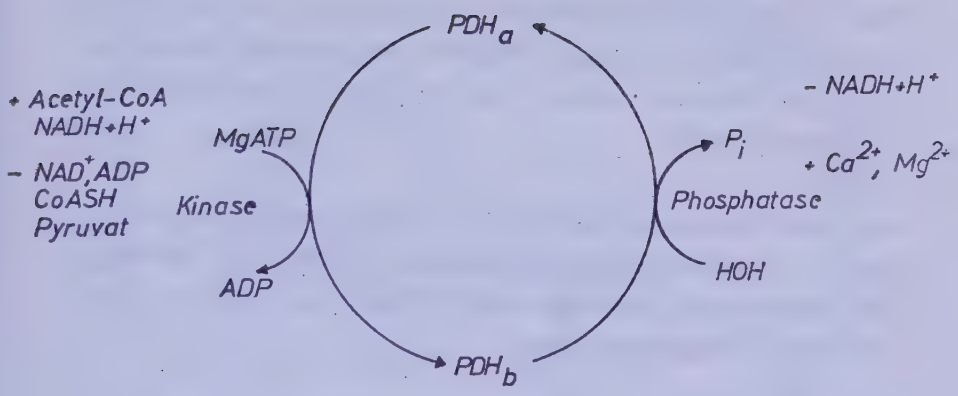


Abb. 2

Phosphorylierungs-, Dephosphorylierungscyclus des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes

PDH_a : aktiv (dphosphoryliert)

PDH_b : inaktiv (phosphoryliert)

1.1

Der Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex: Bedeutung und Stellung im Stoffwechsel

Die besondere Bedeutung des PDH-Komplexes im Stoffwechsel beruht darauf, daß er sich an einem Knotenpunkt mehrerer Stoffwechselwege befindet (s. Abb. 3):
Pyruvat entsteht bei der Glykolyse aus Glucose, aus Lactat und weiterhin aus Aminosäuren wie Alanin oder Cystein. Es kann zu Acetyl-CoA abgebaut werden, das in den Citronensäurecyclus eingeschleust wird.

Bei dieser exponierten Stellung des PDH-Komplexes im Stoffwechsel kann der Substratfluß durch eine exakte Steuerung und Kontrolle der enymatischen Aktivität dieses Enzymsystems jederzeit den Erfordernissen angepaßt werden.

Die Steuermechanismen, die hier zum Einsatz kommen, werden auf der Substrat- wie auch auf hormoneller Ebene gefunden:

- Regulation der Enzymaktivität durch "feed-back"- oder "feed-forward"-Wirkung von Metaboliten auf den PDH-Komplex unmittelbar oder über das Phosphatase-Kinase-System.

- Regulation der Enzymmenge über die chromosomale Ebene durch Induktion und Repression der Enzymsynthese. Eine Steigerung der Gesamtaktivität des PDH-Komplexes wurde

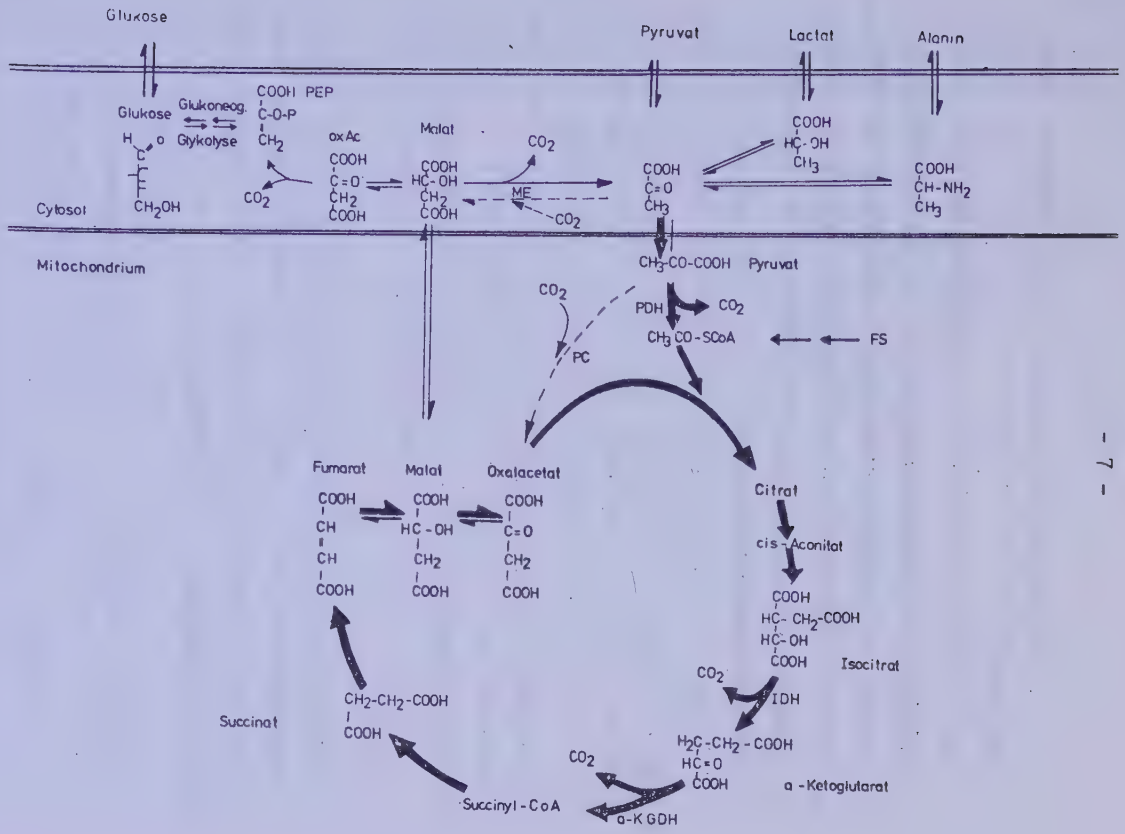


Abb. 3

Scheamtische Übersicht über den Pyruvatstoffwechsel

z.B. beim Übergang zur Laktation in der Mamma der Ratte gefunden (4).

- unmittelbare Regulation der katalytischen Aktivität über Hormone; Der Mechanismus hierbeit ist noch unklar. So scheint Insulin aktivierend auf den PDH-Komplex zu wirken. Es wird diskutiert, daß Ca^{++} hier involviert ist, das als Effektor der Phosphatase deren Affinität für das phosphorylierte Enzym erhöht (5).

1.2
Messung der PDH-Aktivität

Bislang ist die Funktion der PDH im Stoffwechsel vorwiegend durch Messung von Gewebsaktivitäten in Form prozentualer Anteile der aktiven Form an der Gesamtaktivität untersucht worden. Da aber die Messung von Gewebsaktivitäten eines Enzyms nur über die Kapazität Auskunft gibt, kann keinerlei Aussage über den tatsächlichen Durchsatz an Substrat in einer bestimmten Stoffwechselsituation gemacht werden. Will man dieses Problem angehen, eröffnet sich die Möglichkeit, durch Verfolgen des aus Pyruvat entstehenden CO_2 seinen Durchsatz durch den PDH-Komplex zu erfassen.
Bietet man Pyruvat-1-^{14}C als Substrat an, gibt die Menge des pro Zeiteinheit entstehenden $^{14}CO_2$ Aufschluß über die Decarboxylierungsgeschwindigkeit dieses Substrats. Damit kann man auf den Aktivierungsgrad der PDH rückschließen.

Verfolgt man anstelle der $^{14}CO_2$-Produktion aus einer kontinuierlichen Zugabe von Pyruvat-1-^{14}C, z.B. in einem Perfusionsexperiment, das zeitliche Verhalten der $^{14}CO_2$-Produktion bei Zugabe eines Pyruvatpulses zum Perfusionsmedium, so können drei Phasen unterschieden werden:
1) Die Zunahme der $^{14}CO_2$-Produktion zu Beginn der Infusion des markierten Pyruvats ("on-Kinetik").
2) Die Produktion von $^{14}CO_2$ nach Einstellen der Diffusions und metabolischen Gleichgewichte ("steady-state").

3) Der Abfall der $^{14}CO_2$-Produktion nach Beenden der Zugabe von markierten Pyruvat ("off-Kinetik").

Die Halbwertszeit der off-Kinetik stellt einen Parameter für den augenblicklichen Pyruvatdurchsatz durch den PDH-Komplex dar (6). Dabei kann eine kurze Halbwertszeit als hoher Aktivierungsgrad des PDH-Komplexes, eine im Vergleich dazu längere als vermehrtes Vorliegen der inaktiven Form gedeutet werden. Aus derartigen Versuchen lassen sich somit bei verschiedenen metabolischen Bedingungen Änderungen des Pyruvatflusses durch den PDH-Komplex verfolgen.

1.3
Problemstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die bisher an der Leber erprobte Methodik der off-Kinetik-Messung (6) für den perfundierten Muskel zu adaptieren, Grundparameter zu erstellen, die Validität der Methodik zu manifestieren und den Einfluß verschiedener Substrate auf den Pyruvat-Durchsatz der PDH zu untersuchen.

2.
Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für alle Perfusionsexperimente wurden männliche Han:Wistar Ratten mit einem Gewicht von 150 - 200 g verwandt.
Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gezüchtet und erhielten Standardfutter (Höveler, Düren) und Wasser ad libitum.

2.1.2
Reagenzien, Radiochemikalien

Die Biochemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim) und Sigma (München) bezogen. Rinderserumalbumin (Cohn-Fraktion V) wurde von Miles (Frankfurt) bezogen, Evipan-Natrium von Bayer (Leverkusen), Liquemin von Hoffman-La Roche (Grenzach), Alt-Insulin Novo Actrapid von Novo Industrie Pharmaceutika (Mainz). Die übrigen Chemikalien waren Produkte der Firmen Merck (Darmstadt) in p.a. Qualität.
Die Radiochemikalien wurden von den Firmen New England Nuclear (Dreieich) und Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.
Zur CO_2-Absorption wurde Hydroxide of Hyamine, als Scintillationscocktail Permafluor V von der Firma Packard (Frankfurt)

benutzt.

2.1.3

Geräte

Zur Messung der Radioaktivität diente das "Liquid Scintillation Spectrometer Modell 2650" der Firma Packard (Frankfurt). Die verwendeten Perfusionspumpen waren Produkte der Firma Braun-Mesungen (Braunschweig), die eingesetzten Rührmotoren von Janke & Kunkel (Staufen).

2.1.4

Perfusionsmedium

Als Perfusionsmedium wurde Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer benutzt (7). Der Puffer wurde durch Begasen mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) auf einen pH von 7,35 - 7,40 gebracht, nachdem 0,15 mmol Pyruvat/l und 6 % (w/v) Rinderserumalbumin zugesetzt worden waren.

Zusammensetzung des Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffers:

NaCl	118,75 mmol/l
KCl	4,75 mmol/l
$CaCl_2$	2,54 mmol/l
$MgCl_2$	1,05 mmol/l
KH_2PO_4	1,19 mmol/l
$NaHCO_3$	24,76 mmol/l.

2.2
Methoden

2.2.1
Operationsmethode

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Evipan-Natrium (0,2 g/kg Körpergewicht) narkostisiert. Zur Prophylaxe einer intraoperativen Thrombenbildung wurden 1000 USPE Liquemin ebenfalls intraperitoneal injiziert. Die Operation wurde in modifizierter Weise nach Ruderman und Houghton (8) durchgeführt. Unter Berücksichtigung der nicht recirculierenden Perfusion wurde nur ein Hinterbein perfundiert, das andere abgebunden.

2.2.2
Perfusionsapparatur

Die Perfusionsapparatur ist in Abb. 4 schematisch wiedergegeben. Mit Hilfe eines thermostatisierbaren Wasserbades wurde das Perfusionsmedium im Inneren des doppelwandigen Vorratsgefäßes auf eine Temperatur von 37 C gebracht und dabei ständig durch eine von einem Rührmotor getriebene Scheibe umgewälzt, die die Funktion eines Scheibenoxygenators erfüllte.
Aus dem Vorratsgefäß wurde das Perfusionsmedium mittels einer Rollenpumpe durch ein Filter in ein Überlaufgefäß gepumpt, von wo auch das Medium zur Perfusion des Rattenhinterkörpers entnommen werden konnte.

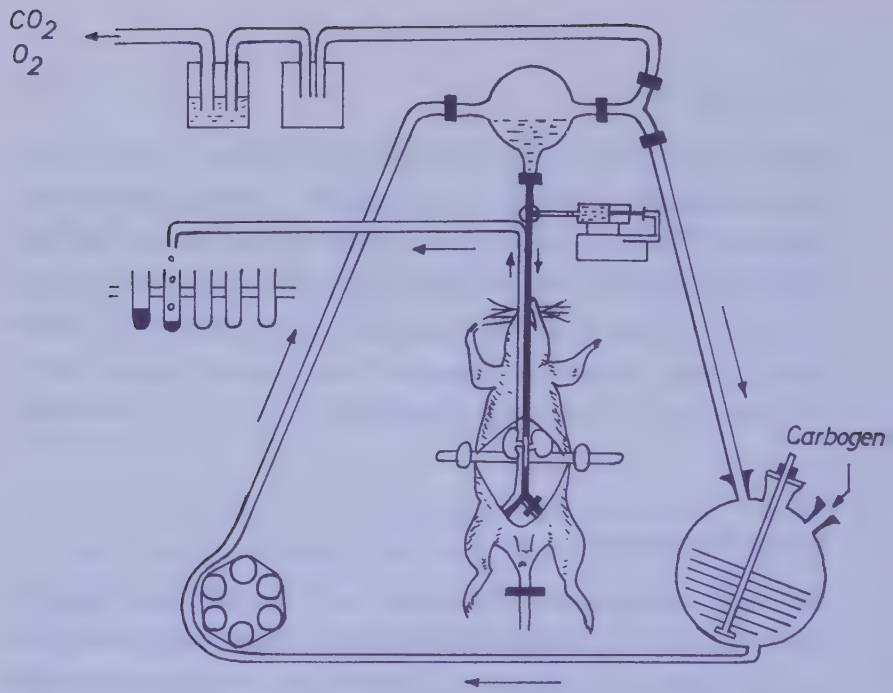


Abb. 4

Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur
Die Pfeile geben die Flußrichtung des Perfusats an.
Weitere Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen.

Die Sauerstoffsättigung des Perfusionsmediums erfolgte durch Begasen mit Carbogen, das nach Passieren einer Waschflasche mit Wasser in das Vorratsgefäß geleitet wurde und von hier durch das Glasrohr und die Waschflaschen strömte. Die Waschflaschen dienten dazu, durch Blasenbildung einen permanenten Gasstrom anzuzeigen. Mittels einer Infusionspumpe ließen sich dem aus dem Überlaufgefäß zur Aorta fließenden Perfusionsmedium pro Zeiteinheit genau definierte Mengen von Substraten zufügen.
Das aus der V. cava inf. der Ratte fließende Perfusat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen.

2.2.3

Validität des Modells des perfundierten Rattenhinterkörpers

Für Stoffwechseluntersuchungen am Skelettmuskel sind verschiedene Modelle eingeführt.

Um Störfaktoren, wie sie z.B. die sezernierten Hormone Glukagon, Adrenalin und besonders Insulin bilden, auszuschalten, bietet sich ein isoliertes Skelettmuskelpräparat an.

So werden beispielsweise das Diaphragma (9), der M. epitrochlearis (10), der M. estensor digitorum longus (11), der M. soleus (12), der hemicorpus (13) oder das eviscerierte Tier (14) als in vitro Modelle benutzt. Die vorliegenden Untersuchungen wurden am isoliert perfundierten Hinterkörper der Ratte durchgeführt, da dieses Präparat gegenüber den genannten einige Vorteile aufweist:

Das perfundierte Muskelgewebe wird bei der notwendigen Präparation nicht durch externe Manipulationen geschädigt und das intakt bleibende Gefäßsystem läßt keine Diffusionsprobleme entstehen.

Vorteilhaft ist ebenso, daß ein relativ hoher Anteil der Muskelmasse der Ratte, etwa 40%, zur Perfusion kommt. Bei einer 180 g schweren Ratte werden so 30 g Muskulatur perfundiert (8).

Durch die Präparation werden die Grenzflächen zwischen perfundierten und nicht perfundierten Bezirken klein gehalten und die Gefäßversorgung perfundierter Bereiche von der nicht perfundierter Zonen separiert (15).

Andere Autoren konnten zeigen, daß bei unterschiedlichsten Perfusionsbedingungen der Gehalt an energiereichen Phosphaten im M. gastrocnemius konstant bleibt und im physiologischen Bereich liegt (8, 15, 16).

Nachteilig am verwendeten Präparat ist die Tatsache, daß auch nichtmuskuläres Gewebe mitperfundiert wird. Nach Untersuchungen in (8, 15) besteht das Präparat zu ca. 70% aus Muskelgewebe. Haut, subkutanes Fett und Knochen bilden den Rest.

Die durch Sauerstoffverbrauchsmessungen ermittelte Stoffwechselaktivität des perfundierten Muskelgewebes beträgt etwa 85 - 90 % des gesamten Präparates (8, 15), so daß der isoliert perfundierte Hinterkörper der Ratte trotz der genannten Einschränkungen als Skelettmuskelpräparat bezeichnet werden kann.

2.2.4

^{14}C- und $^{14}CO_2$ - Messungen im venösen Perfusat

Das venöse Perfusat wurde in Zeitabständen von 6 sec fraktioniert und in Reagenzgläsern aufgefangen. Bestand die Notwendigkeit einer höheren zeitlichen Auflösung der off-Kinetik, wurde in kürzeren Zeitabständen fraktioniert.

Die ^{14}C- sowie die $^{14}CO_2$-Messung erfolgte mittels Liquidszintillationszählung.

Für die ^{14}C-Messung wurden 0,5 ml venöses Perfusat in 10 ml Scintillationsflüssigkeit gelöst. Für die $^{14}CO_2$ Messung wurde ein spezielles Gasentwicklungs- und -absorptionsgefäß verwendet (Abb. 5): In das innere, kleine PVC-Gefäß wurden 200 ul venöses Perfusat gefüllt, in das äußere, größere PVC-Gefäß 1 ml Hydroxide of Hyamine. Durch Zugabe von 2 ml 1 mol Zitronensäure/l zum venösen Perfusat wurde das gesamte CO_2 ausgetrieben und in die Absorptionslösung überführt.

Nach 24 h wurde der Inhalt des äußeren PVC-Gefäßes mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit aufgenommen und darin die Radioaktivität bestimmt.

Abb.5
Gasentwicklungs- und
-absorptionsgefäß

3.
Ergebnisse und Diskussion

3.1
Grundparameter der Methodik

Um die Validität der angewendeten Methode der off-Kinetik zu manifestieren, sind unterschiedliche Grundparameter erstellt worden. An Hand dieser Parameter lassen sich die Aussagekraft und die Grenzen der Methodik aufzeigen.

3.1.1
On- und off-Kinetik nach der Infusion von 1-^{14}C-Pyruvat

Das benutzte Perfusionsmedium enthielt 0,15 mmol Pyruvat/l. Durch Zugabe von 1-^{14}C-Pyruvat in Tracermengen und Auffangen des venösen Perfusats ließen sich die Ein- und Auswaschkurven der Gesamtradioaktivität sowie die von $^{14}CO_2$ ermitteln (Abb. 6).

Kurz nach Beginn der radioaktiven Infusion steigen die Konzentrationen von radioaktiv markiertem Substrat und Reaktionsprodukt an und erreichen ein Plateau, wenn die Einstellung der metabolischen und Diffusionsgleichgewichte beendet ist. Nach dem Absetzen der Infusion fallen beide Kurven beim Normaltier zunächst sehr rasch und angenähert exponentiell, dann verlangsamt ab.
Von besonderem Interesse ist hierbei der anfänglich quasi-lineare

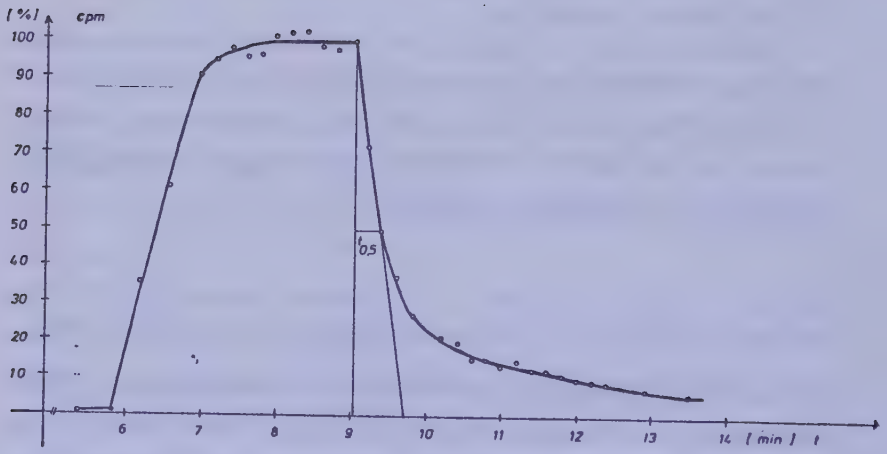


Abb. 6
On- und off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat

exponentielle Abfall der $^{14}CO_2$-Aktivitätskurve. Da $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat in der PDH-Reaktion entstehen muß, gibt diese Kurve einen Einblick in die momentane Geschwindigkeit der PDH-Reaktion. Als Maß für die Oxidationsrate von Pyruvat kann die Zeit gelten, in der die Aktivität des $^{14}CO_2$ vom Maximalwert während der Plateauphase auf die Hälfte abgesunken ist (6).

Diese Halbwertszeit wurde sowohl grafisch durch Anlegen der Tangente an die Kurve als auch mathematisch durch Berechnung einer Regressionsgeraden oder einer exponentiellen Regression ermittelt. Diese unterschiedlichen Methoden erbrachten keinerlei Unterschied für die sich daraus ergebenden Halbwertszeiten. Anschließend wurde die so gewonnene Halbwertszeit auf eine Durchflußrate des Perfusionsmedium von 20 ml/min normiert.

Tabelle 1 gibt die derart ermittelten Halbwertszeiten der off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat (HWZ-$^{14}CO_2$) für Normaltiere wieder.

n	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ (sec)
1	24,0
2	21,4
3	23,7
4	19,1
5	21,1
6	20,6

Mittelwert x = 21,7 sec $\pm$ 1,9 (SEM)

Tab. 1

Halbwertszeiten der Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat bei Normaltieren

Er beträgt 21,7 sec. Dieser Wert stellt eine Vergleichsgröße für unter anderen Versuchsbedingungen erhaltene Halbwertszeiten dar.

3.1.2

Abhängigkeit der off-Kinetik vom Verteilungsraum

Die off-Kinetik eines radioaktiven Tracers, wie z.B. 1-^{14}C-Pyruvat, spiegelt nicht nur zelluläre Prozesse wider, sondern ist zusätzlich überlagert von Einflüssen des Verteilungsraums sowie apparativen Größen.

Um die Abhängigkeit der off-Kinetik einer Substanz von der Größe seines Verteilungsraumes zu erfassen, wurden in Perfusionsexperimenten die Halbwertszeiten der off-Kinetiken von $^{3}H_2O$, ^{3}H-Inulin, ^{14}C-Lactat sowie ^{14}C-Saccharose bestimmt.

Da diese Substanzen z.T. sehr unterschiedliche Verteilungsräume im Organismus haben, treten die hierdurch bedingten Unterschiede der off-Kinetik deutlich hervor.

Der Verteilungsraum von Wasser ist das Gesamtkörperwasser (50-70% des Körpergewichtes). Inulin dagegen verteilt sich nur im Extrazellulärraum (ca. 22% des Körpergewichtes). Die Halbwertszeiten der off-Kinetiken dieser beiden Substanzen spiegeln diesen Unterschied wider (Tab. 2). Gleichzeitig repräsentieren sie Grenzwerte; innerhalb dieser Wertespanne müssen Metaboliten verfolgt werden können, die intrazellulär aus

exogen angebotenem Substrat entstehen und nicht durch Einbau oder Rezirkulation in ihrer Auswaschkinetik stark verzögert werden. Die CO_2-Freisetzung aus 1-^{14}C-Pyruvat stellt eine Reaktion dar, die in dieser Weise verfolgt werden kann, weil der Muskel nur in untergeordnetem Maß zu einer CO_2-Fixierung fähig ist (17, 19).

Substanz	t o,5 (sec)
^{3}Inulin	15
^{3}Inulin (unter Arbeit)	16
^{14}Saccharose	18
^3H_2O	62,8
$^{14}CO_2$ aus Lactat	44,0

Tab. 2
Halbwertszeiten der off-Kinetiken verschiedener Substanzen zur Erfassung des Einflusses des Verteilungsraumes
(n=2, $t_{0,5} \pm 3$ sec)

Die nur geringe Abweichung der unter Reizung des N. ischiadicus gefundenen Halbwertszeiten der off-Kinetik von Inulin von der normalen Halbwertszeit zeigt, daß Strombettveränderungen bei Arbeitsversuchen vernachlässigt werden können.

3.1.3

Einfluß der Substratkonzentration auf die PDH-Reaktion

Bei optimalen Bedingungen und konstanten Enzymkonzentrationen nimmt mit steigender Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion bis zu einem Maximum zu.
Mit einer Infusionspumpe wurden steigende Pyruvatkonzentrationen extrazellulär angeboten.
Bei den Konzentrationen 0,4 , 1,3 , 2,2 , 4,4 mmol Pyruvat/l im Perfusionsmedium erfolgte jeweils nach einer Äquilibrierungsphase von 10 min eine 5 min Infusion von 1-^{14}C-Pyruvat (800.000 dpm/min). Die off-Kinetiken des aus dem 1-^{14}C-Pyruvat stammenden $^{14}CO_2$ wurden verfolgt (Tab. 3) und nach Michaelis-Menten aufgetragen (Abb 7).

Konzentration an Pyruvat	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
0,4 mmol/l	24 sec
1,3 mmol/l	21 sec
2,2 mmol/l	18 sec
4,4 mmol/l	15 sec

Tab.3

Halbwertszeiten der off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-$^{14}CO_2$-Pyruvat bei unterschiedlicher Konzentration an Pyruvat (n=2, $t_{0,5} \pm 3$ sec)

Aus der Abbildung kann man ersehen, daß in Abhängigkeit der Substratkonzentration die Halbwertszeit verkürzt ist. Um festzustellen, ob der PDH-Komplex durch ein steigendes Angebot von Pyruvat aktiviert wird, wurde nach Eadie-Scatchard aufgetragen (Abb 8). Die Abweichung von einer Geraden deutet darauf hin, daß neben der normalen enzymatischen Parameter weitere Einflüsse bei der Reaktion in Betracht gezogen werden müssen. Auf die unterschiedlichen Interpretationsmöglichkeiten wird im Kapitel 3.2 eingegangen.

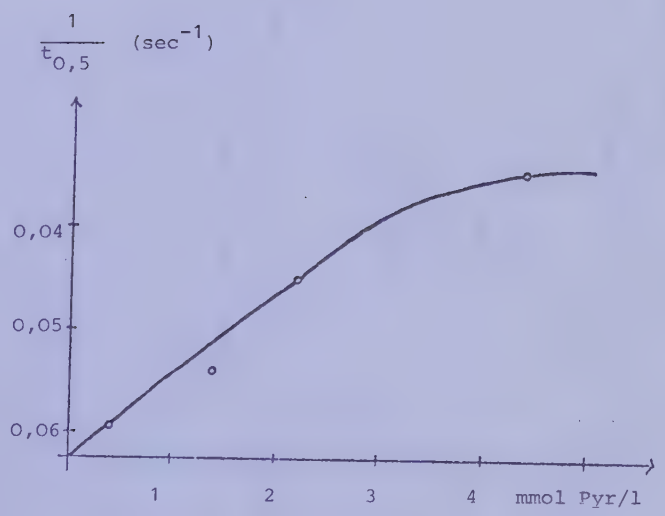


Abb. 7
Michaelis-Menten Plot der Pyruvatoxidationsrate (dargestellt mit v als $1/t_{0,5}$) in Abhängigkeit der Pyruvatkonzentration im Perfusionsmedium

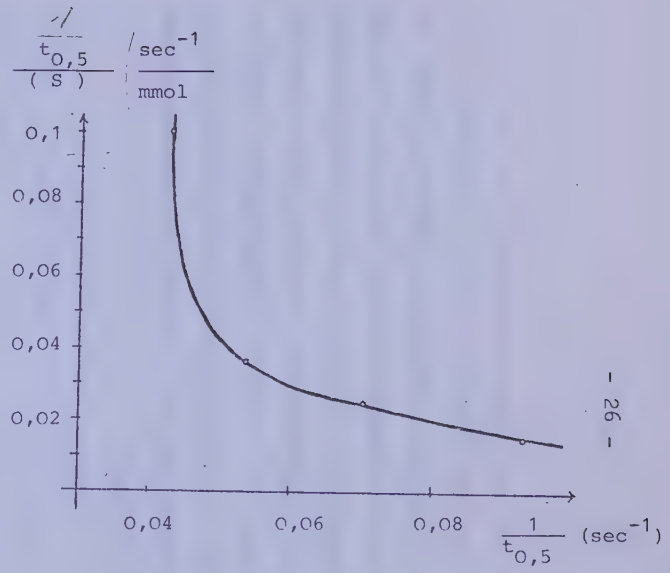


Abb. 8
Eadie-Scatchard Plot der Werte aus Abb. 7 (s. Tabelle 3)

3.1.4

Einfluß der Temperatur auf die PDH-Reaktion

Das Perfusionsmedium wurde mit Hilfe eines temperierten Wasserbades auf Temperaturen zwischen 13 und 37°C gebracht. Bei 13, 23 und 37°C erfolgte jeweils nach einer 10 minütigen Äquilibrierungsphase eine 5 Minuten dauernde Infusion von 1-^{14}C-Pyruvat (800 000 dpm/min).

Die off-Kinetiken des aus dem Tracer stammenden $^{14}CO_2$ wurden für die jeweiligen Temperaturen verfolgt.

Die ermittelten Halbwertszeiten sind in Tabelle 4 und Abb. 9 angegeben. Der Q_{10} ergibt sich hier zu 1,4. Zum Vergleich: in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber wurde ein Q_{10} von 3,2 ermittelt (6).

Temperatur	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
13°C	46 sec
23°C	30 sec
37°C	21 sec

Tab. 4

Halbwertszeiten der Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat bei verschiedenen Temperaturen (n=2, $t_{0,5} \pm 3$ sec, 0,15 mmol Pyruvat/l)

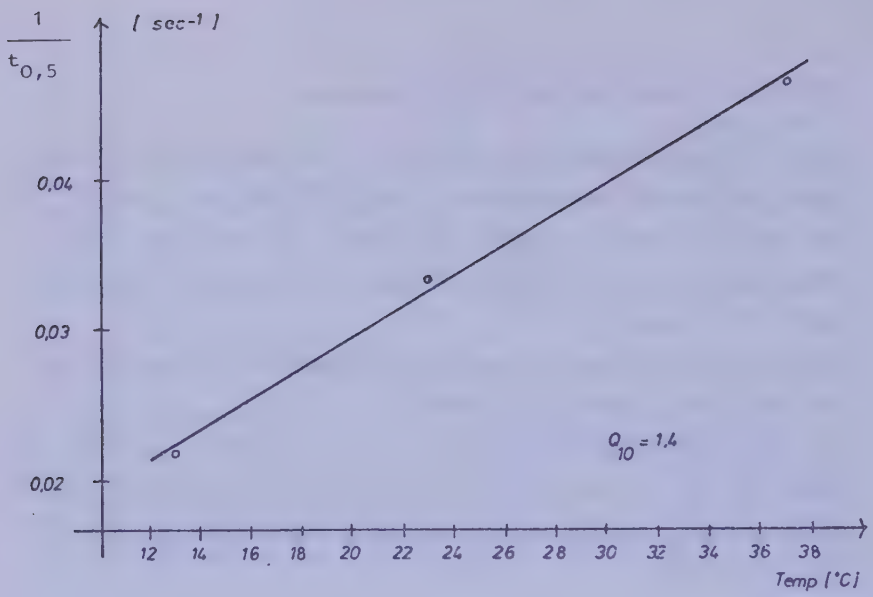


Abb. 9

Bestimmung des Q_{10}: Darstellung der Pyruvatoxidationsrate in Abhängigkeit von der Temperatur

3.1.5

Einfluß des energetischen Zustandes auf die PDH-Reaktion

Dinitrophenol wirkt als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette. Trotz gesteigerten Elektronenflusses kommt es nicht zur Bildung von ATP. Als Folge hiervon werden verstärkt mitochondriale Flavin- und Pyridinnukleotide oxidiert. Über die erhöhte Konzentration von NAD und das Absinken des ATP-Gehaltes im Mitochondrium kommt es zu einer Verschiebung des energetischen Profils, das zu einer Aktivitätssteigerung der PDH führen sollte (in (1)).
Mit Hilfe einer zweiten Infusionspumpe wurde dem Perfusionsmedium Dinitrophenol zugeführt, so daß die Endkonzentration 0,05 mmol/l betrug. Die ermittelte Halbwertszeit in zwei Versuchen:

$17{,}4 \pm 3$ sec.

3.2

Zusammenfassende Besprechung der Methodik der off-Kinetik Messung und ihrer Grundparameter

Die Methode, die Auswaschkinetik einer radioaktiv markierten Substanz zu verfolgen, beruht auf der Überlegung, daß nach Absetzen der Verbindung aufgrund der intrazellulären Poolgrößen und der Transportmechanismen über die beteiligten Membranen die markierte Substanz entsprechend dem Konzentrationsgefälle verzögert folgt.

Ist die interessierende Größe Produkt einer Reaktion, folgt diese ebenfalls verzögert der Auswaschkinetik des Substrats, zusätzlich aber beeinflußt von der aktuellen Umsatzrate.

Theoretisch sollte demnach der Substratpool langsamer geleert werden als das perfundierte System, der Produktpool wiederum langsamer als der Substratpool. So kann die Entleerung des Produktpools die Umsatzrate Substrat zu Produkt widerspiegeln (Abb. 10).

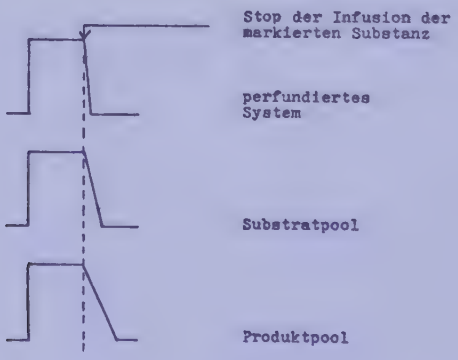


Abb. 10
Schema zur Poolentleerung nach Beenden der Infusion eines radioaktiven Tracers

Für ein System von Interesse sollten die Grenzwerte bekannt sein, um Änderungen einer Reaktion einordnen zu können. Für den extrazellulären Raum gilt Inulin als geeignete Testsubstanz für das Verhalten des Perfusionssystems. Derart können auch Flußbettveränderungen im perfundierten Organ verfolgt werden, die Änderungen von Umsatzraten vorzutäuschen vermögen. Die Inulin-Auswaschkinetik zeigt eine durchschnittliche Halbwertszeit von 14,6 sec. Unterhalb dieses Wertes sind demnach, vom Perfusionssystem vorgegeben, keinerlei Messungen möglich.

Um abschätzen zu können, wie sich frei über das Gefäß- und zelluläre System diffundierende Substanzen verhalten, die demnach weder im Stoffwechsel fixiert noch aktiv über Membranen transportiert werden, wurde $^{3}H_2O$ benutzt und somit die obere Grenze für Substanzen, die z.B. erleichtert transportiert werden, zu 62 sec ermittelt.

Für Pyruvat wird zunächst eine erleichterte Diffusion über die Plasmamembran, dann aktiver Transport über die Mitochondrienmembran diskutiert. Ein ähnliches Verhalten zeigt Saccharose, ohne jedoch in bemerkenswertem Maße verstoffwechselt zu werden. Die ermittelte Halbwertszeit beträgt 17,7 sec. Mit diesem Wert ist ein Richtwert für die Entleerung des Pyruvatpools gefunden. Die $^{14}CO_2$ Auswaschkinetik aus 1-^{14}C-Pyruvat zeigt durchschnittlich einen Wert von 21 sec, liegt damit zwischen den von Inulin und $^{3}H_2O$ gesetzten Grenzen und oberhalb der Auswaschkinetik des Substrates selbst. Daraus kann gefolgert werden, daß eine Pyruvat-

Oxidationsrate anhand der $^{14}CO_2$ Freisetzung aus 1-^{14}C-Pyruvat mittels der off-Kinetik verfolgt werden kann.

Weiter ist aufzuzeigen, daß die Pyruvatoxidationsrate metabolisch beeinflußbar ist. Verschiebt man mit Hilfe von Dinitrophenol das Energieprofil der Muskelzelle, so daß ADP und NAD einen optimalen Aktivierungsgrad der PDH ermöglichen, wird eine Halbwertszeit von 17,4 sec gefunden. Dieser Wert zeigt, daß die Auswaschkinetik des Produktes der des Substrates eng folgt; das spricht dafür, daß hiermit ein Wert vorliegt, der aus systemischen Gründen nicht unterschritten werden kann. Infusion von Acetoacetat auf der anderen Seite, das nach Umsatz zu Acetyl-CoA einen hemmenden Einfluß (Produkthemmung) auf die PDH-Reaktion zeigen sollte, ergibt einen Meßwert für die Auswaschkinetik von 40 sec, also signifikant länger als beim Normaltier.

Aus diesen Werten für die $^{14}CO_2$-Auswaschkinetik aus 1-^{14}C-Pyruvat kann gefolgert werden, daß Bedingungen, die eine Aktivierung der PDH hervorrufen, nicht mit signifikanten Werten belegt werden können, jedoch Werte ergeben, die einen Hinweis für eine Aktivierung abzuleiten gestatten. Hemmende Einflüsse auf die PDH Reaktion hingegen können mit Sicherheit verfolgt werden.

Es ist aber die Frage aufzuwerfen, in welcher Abhängigkeit die Veränderungen der Halbwertszeit vom Aktivierungsgrad der PDH stehen. Ein Parameter, der eine Aussage über Änderungen des Aktivierungsgrades des Enzyms zu liefern vermag, ist das Verhalten der Produktbildung bei steigendem Substratangebot. Im

Normalfall einer Kinetik nach Michaelis-Menten sollte die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Maximalwert ansteigen und auch bei weiterer Substratkonzentrationserhöhung diesen nicht übersteigen. In der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk (1/v gegen 1/(S); hier = HWZ $t_{0,5}$ gegen 1/(S)) ergibt sich für diesen Fall eine lineare Abhängigkeit. Die Werte in einem derartigen Versuch (s.Kap.3.1.3, Abb.7 und Tab.4) ergeben jedoch einen von der Michaelis-Menten Kinetik abweichenden Kurvenverlauf, der über einen Eadie-Scatchard Plot auf eine negative Kooperativität zwischen Substrat und Enzym(en) hinweist. Dies läßt verschiedene Deutungen zu. Der Eadie-Scatchard Plot läßt keine Unterscheidung zwischen Reaktionen zu, bei denen verschiedene Enzyme unterschiedlicher Substrataffinität beteiligt sind, und Reaktionen, bei denen ein Enzym mit unterschiedlichen Substratbindungsstellen verschiedener Affinität teilnimmt (18).
So müssen neben der Möglichkeit einer negativen Kooperativität zwischen Pyruvat und der PDH die Konkurrenz mehrerer Enzyme um das Substrat oder Reaktionswege für Pyruvat als Substrat diskutiert werden. Als konkurrierende Enzyme für die PDH stehen die Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.2) zur Diskussion. Zur Frage, ob Pyruvat mit Hilfe einer pyruvatcarboxylierenden Reaktion zu Oxalacetat umgesetzt werden kann, sei auf Kapitel 3.4 verwiesen. Eine Pyruvatcarboxylase Aktivität (EC 6.4.1.1) konnte im Skelettmuskel bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Wie alle chemischen Reaktionen ist auch die enzymatische Katalyse temperaturabhängig. Steigende Temperaturen führen über die zunehmende kinetische Energie der reagierenden Moleküle zu steigenden Reakionsgeschwindigkeiten. Dieser geschwindigkeitssteigernde Effekt der Temperatur wird durch die bei hohen Temperaturen einsetzende Denaturierung der Enzymproteine begrenzt. Der Einfluß der Temperatur auf die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion ließ sich mit der Methode der Halbwertszeitbestimmung in der erwarteten Form deutlich machen. In einem Bereich von 13 bis 37 C ergab sich ein lineares Verhältnis zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit v (in Abb.9 als 1/Halbwertszeit eingetragen) und der Temperatur. Es resultierte ein Q_{10} von 1,4.

3.3
Einfluß verschiedener Substrate auf die Pyruvatdecarboxylierung

3.3.1
Einfluß von Ammoniumionen und Glutaminsäure auf die PDH-Reaktion

In Experimenten an der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber konnten Häussinger et al. die Aktivität des PDH-Komplexes durch die Infusion von Ammoniumchlorid erhöhen (20). Diese Aktivitätserhöhung wurde auf die Harnstoffsynthese aus exogenem Ammonium zurückgeführt. Nicht der hierdurch gesteigerte Energiebedarf und der dadurch verminderte ATP Gehalt soll hierfür allein verantwortlich sein, sondern darüber hinaus ein Absinken der mitochondrialen Konzentration an 2-Oxoglutarat, das für die reduktive Aminierung bei der Ammoniakfixierung benötigt wird.
Diesen Untersuchungen folgend war bei Experimenten an der perfundierten Skelettmuskulatur ein Ausbleiben der Aktivierung zu erwarten, weil dieses Organ keine Harnstoffsynthese durchführt. Gefunden wurde in den entsprechenden Experimenten nicht nur ein Ausbleiben eines Effektes, sondern eine Hemmung durch NH_4-Ionen (Tab. 5).

Konzentration an NH_4Cl	$t_{0.5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
3,6 mmol/l	38 sec
4,5 mmol/l	36 sec
5,7 mmol/l	45 sec

Tab.5

Halbwertszeiten der Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat (0,15 mmol/l) unter NH_4Cl-Zusatz zum Perfusionsmedium (n=2; $t_{0,5}$ $\pm$ 3 sec bei Anwesenheit von 0,15 mmol Pyruvat/l)

Konzentration an Glutaminsäure	$t_{0.5}$ $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
0,8 mmol/l	22
3,6 mmol/l	48

Tab. 6

Halbwertszeiten der off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat (0,15 mmol Pyruvat/l) bei Glutaminsäurezusatz zum Perfusionsmedium (n=2; $t_{0,5}$ $\pm$ 3 sec, 0,15 mmol Pyruvat/l)

Die Infusion von Glutaminsäure führte zu den in Tabelle 6 angegebenen Halbwertszeiten.

Diese Befunde im Zusammenhang geben Anlaß, den Grund für die Hemmung der PDH durch 2-Oxoglutarat zu sehen, das an Transaminierungsreaktionen zu Glutamat und Aminierungsreaktionen zu Glutamin beteiligt ist. Eine ähnliche Argumentation wird von Häussinger et al. für die Rattenleber geführt. Diese Autoren finden eine Hemmung der PDH nach Gaben von Glutamin und Aktivierung der Glutaminase durch NH_4Cl aufgrund gesteigerten Mehrangebots von 2-Oxoglutarat (21).

3.3.2

Einfluß von Dichloracetat auf die PDH-Reaktion

Durch die Arbeiten von Whitehouse, Cooper und Randle ist die Wirkung von Dichloracetat auf den PDH-Komplex aufgehellt worden (23).

Dichloracetat wirkt demnach als Inhibitor der PDHa-Kinase. Durch diese Hemmwirkung kommt es zu einer Veränderung des Verhältnisses PDHa/PDHb und somit zu einer Steigerung der Aktivität des PDH-Komplexes.

In einem Titrationsversuch an der hämoglobinfrei perfundierten Skelettmuskulatur der Ratte ergaben sich die in Tab. 7 angegebenen Werte für die off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat.

Bei geringen Konzentrationen von Dichloracetat (0,6 mmol/l) ließ sich eine Beschleunigung der Halbwertszeit, mit größeren Konzentrationen (2,5 mmol/l) eine Verlangsamung der Halbwertszeit der Auswaschkurve von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat gegenüber der dichloracetatfreien Perfusion erzielen.

Der Effekt einer Inaktivierung der PDH-Reaktion bei hoher Dosierung von Dichloracetat wurde bisher nicht beobachtet. Es ist zu diskutieren, ob Dichloracetat in einer Dosierung von 2,5 mmol/l bereits toxisch wirkt, was aber durch Perfusion desselben Präparates nach Auswaschen von Dichloracetat durch Wiederfinden einer normalen Pyruvatkinetik ausgeschlossen sein sollte.

Andererseits entspricht die Struktur des Dichloracetats der des Pyruvats, so daß bei diesen Konzentrationen eine kompetitive Hemmung als plausibelster Grund für die Beobachtung angenommen wird.

Konzentration an Dichloracetat	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyr
0,6 mmol/l	16 sec
1,3 mmol/l	18 sec
2,5 mmol/l	28 sec
anschließend	
0 mmol/l	21 sec

Tab.7

Halbwertszeiten der off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat gemessen unter Dichloracetatzusatz zum Perfusionsmedium mit 0,15 mmol Pyruvat/l. Der ohne Dichloracetatzusatz erhaltene Normwert nach Auswaschen des zugesetzten Dichloracetats bei demselben Präparat läßt auf dessen Intaktheit schließen (n=2, $t_{0,5} \pm 3$ sec, 0,15 mmol Pyruvat/l).

3.3.3

Einfluß von Acetoacetat und ß-Hydroxybutyrat auf die PDH-Reaktion

Acetoacetat und ß-Hydroxybutyrat stehen über die ß-Hydroxybutyrat Dehydrogenasereaktion mit dem mitochondrialen NAD-System in Verbindung. So läßt sich durch die Infusion von Acetoacetat das NAD-System oxydieren und durch die Infusion von ß-Hydroxybutyrat reduzieren. Demzufolge könnte eine Acetoacetatinfusion über ein daraus resultierendes Mehrangebot an mitochondrialem NAD, das hemmend auf die PDHa-Kinase wirkt, einen aktivierenden Einfluß auf die PDH haben. Die Infusion von ß-Hydroxybutyrat sollte dann den gegenteiligen Effekt, eine Hemmung der PDH, zeigen, da nun die Konzentration von mitochondrialem NADH, ein Hemmstoff der PDHb-Phosphatase, steigt.

Aus den Arbeiten von Hagg et al. ist bekannt, daß Acetoacetat (2 mmol/l) über daraus entstehendes AcetylCoA bei Rattenhinterkörperperfusionen die Konzentration der in vitro bestimmten aktiven Form der PDH in Ruhe um 50% senkt (27).

Bei Perfusionsexperimenten an der Skelettmuskulatur der Ratte ergaben sich für die Halbwertszeit von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat die in Tab. 8 angegebenen Werte.

Konzentration an Acetoacetat	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
0,7 mmol/l	38 sec
1,4 mmol/l	35 sec
3,0 mmol/l	39 sec

Konzentration an ß-Hydroxybutyrat	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
7,7 mmol/l	16 sec
9,4 mmol/l	17 sec

Tab. 8
Halbwertszeiten der off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat gemessen unter Acetoacetat- und ß-Hydroxybutyratzusatz zum Perfusionsmedium (0,15 mmol Pyruvat/l; n=2; $t_{0,5} \pm 3$ sec)

Die verwendeten hohen Dosen an ß-Hydroxybutyrat wurden eingesetzt, um eine möglichst hohe Inhibierung der PDH zu bewirken. Der überraschend gefundene Effekt einer optimalen Aktivierung, vergleichbar mit der durch DNP, spricht jedoch sowohl gegen eine Änderung des Redoxstatus des die PDH-beeinflussenden NAD/NADH Systems als auch gegen eine hiermit verbundene vermehrte Bildung von AcetylCoA.

3.3.4

Effekt von Octanoat auf die PDH-Reaktion

Die Oxidation von Fettsäuren führt zu einer Inaktivierung des PDH-Komplexes. Dieser Effekt wurde sowohl am intakten Gewebe (31, 32) als auch an isolierten Mitochondrien (33, 34) gezeigt.
Die Gründe für die Inhibierung der PDH bei Fettsäureoxidation werden in erhöhten Verhältnissen von ATP/ADP, NADH/NAD und AcetylCoA/CoA gesehen.
Im Perfusionsexperiment wurden dem Perfusionsmedium steigende Mengen Octanoat zugesetzt und die sich dabei einstellende Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat bei einer gesamten Pyruvatkonzentration von 0,15 mmol/l verfolgt (s. Tab. 9).

Konzentration an Octanoat	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
0,1 mmol/l	34 sec
0,3 mmol/l	28 sec
0,6 mmol/l	28 sec
1,2 mmol/l	24 sec

Tab. 9
Halbwertszeiten der Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat bei Anwesenheit von Octanoat (0,15 mmol Pyruvat/l; n=2; $t_{0,5} \pm 3$ sec)

Als Ergebnis dieser Untersuchung wird eine Verminderung der Hemmung der PDH mit steigenden Dosen an Octanoat gefunden. Ein Ausbleiben einer Inhibierung der PDH durch Fettsäureinfusion wird auch von Taylor (35) bei geringen Pyruvatkonzentrationen berichtet; Scholz teilt mit, daß bei Pyruvatkonzentrationen von 1 mmol/l Gaben von Octanoat zu einem Anstieg der Pyruvatoxidation führen, während bei Konzentrationen von 5 mmol/l ein hemmender Effekt durch Fettsäuren zu beobachten ist (28). Eine Erklärung wird von keinem der genannten Autoren gegeben.

3.4

Effekt von Arbeit auf die PDH-Reaktion

In den Arbeiten von Hennig et al. und Hagg et al. wird eine Aktivierung der PDH durch Muskelarbeit berichtet (27, 36). Die Autoren beobachteten einen Anstieg des aktiven Anteils der Gesamt-PDH von 15,5 auf 40,8% (Hennig) und von 22,2 auf 48,6% (Hagg).

Diese Daten beruhen auf einer optimierten Messung der Enzymaktivität nach Entnahme und entsprechender Aufarbeitung des Muskelgewebes (in vitro - Messung). Derartige Untersuchungen geben jedoch nur indirekte Hinweise auf den aktuellen Pyruvatdurchsatz durch den PDH-Komplex und gestatten keinerlei Aussage über die Reaktionsvorgänge, die den Substratfluß initial beeinflussen. Die Methodik der off-Kinetik Messung des aus ^{14}C-Pyruvat entstehenden $^{14}CO_2$ bietet nunmehr einen Zugang, den augenblicklichen Durchsatz von Pyruvat durch den PDH-Komplex zu verfolgen.

Nach einer Äquilibrierungsphase von 15 min erfolgte 5 min eine Infusion von Tracermengen 1-^{14}C-Pyruvat. In unterschiedlichen Zeitspannen vor dem Ende dieser Tracergaben wurde der N. ischiadicus ununterbrochen bis zum Ende des Versuchs elektrisch gereizt (5 Hz, 1 ms, 2V). Die dabei ermittelten Halbwertszeiten sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Im Vergleich zum Normaltier ergeben sich deutlich verlängerte

Halbwertszeiten, die auf einen verlangsamten oder verminderten Pyruvatdurchsatz hinweisen.

Reizdauer vor Ende der 1-^{14}C-Pyruvat Infusion	$t_{0,5}$ von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat
0,5 min	44 sec
2,5 min	41 sec
10 min	39 sec
+ Glucose + Insulin	
5 min	20 sec

Tab. 10
Halbwertszeiten der off-Kinetik von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat gemessen unter Reiz des N. ischiadicus.
(0,15 mmol Pyruvat/l, 44 mmol Glucose/l, 1 mU Insulin/ml, n=2, $t_{0,5} \pm 3$ sec)

Gleichzeitige Gaben von Glucose und Insulin in der angegebenen Konzentration unter diesen Bedingungen zeigen Werte, die im Bereich von Normaltieren liegen.
Diese Befunde ließen unter Berücksichtigung der von Hagg und Hennig berichteten Aktivierung einer PDH-Aktivität vermuten, daß am enzymatischen Wirkungsort ein Substratmangel auftreten könnte. Daher wurden in weiteren Versuchen initiale Regulationen

mit Hilfe von Verlaufskurven der $^{14}CO_2$ Entwicklung aus ^{14}C-Pyruvat verfolgt. Abbildung 11 gibt eine Zusammenschau des zeitlichen Verlaufs der $^{14}CO_2$ Entstehung aus unterschiedlichen Substraten: 1-^{14}C-Pyruvat, 3-^{14}C-Pyruvat und U-^{14}C-Oleat.

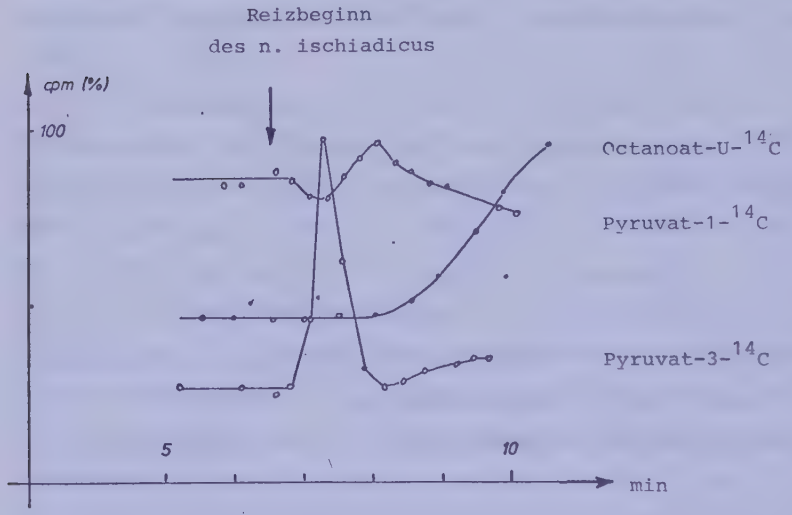


Abb. 11

Zeitlicher Verlauf der $^{14}CO_2$-Entstehung aus unterschiedlichen Substraten nach Arbeitsbeginn

Die gegenläufigen Entwicklungsraten von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat und U-^{14}C-Oleat unter gleichen Bedingungen werden als die bekannte Umschaltung von der Glykolyse zur Fettsäureoxidation gesehen. Auffallend aber ist der zeitliche Verlauf der $^{14}CO_2$-Entwicklungskurven aus 1-^{14}C-Pyruvat und 3-^{14}C-Pyruvat unmittelbar nach Arbeitsbeginn. Mit einem Einbruch der Decarboxylierung von 1-^{14}C-Pyruvat beginnt ein starker Anstieg einer CO_2-Entwicklung aus 3-^{14}C-Pyruvat, mit dem ein Wiederanstieg der Decarboxylierung des 1-^{14}C-Pyruvat verbunden ist. Nach Überschreiten eines Maximums und Rückkehr der $^{14}CO_2$ Kurve aus 3-^{14}C-Pyruvat in die Größenordnung der Ausgangsrate überschreitet die CO_2 Entwicklung aus 1-^{14}C-Pyruvat ihr Maximum und fällt kontinuierlich ab, begleitet vom Anstieg der Oxidation der Fettsäure.

3.4.1

Interpretation der unter Arbeit gefundenen Kurvenverläufe

Die oben beschriebenen und dargestellten Kurvenzüge der $^{14}CO_2$-Entwicklung aus ^{14}C-Pyruvat (Abb.11) können als anaplerotische Reaktion zur Auffüllung des Citratcyclusses interpretiert werden, weil eine Verdünnung des $^{14}CO_2$-Pyruvat im Pyruvatpool durch Einstrom von Pyruvat aus der Glykolyse als Erklärung nicht ausreicht.

Der Abfall der $^{14}CO_2$-Entwicklung aus 1-^{14}C-Pyruvat könnte zwar derart interpretiert werden, die $^{14}CO_2$-Entwicklung aus 3-^{14}C-Pyruvat müßte jedoch einen gleichartigen Verlauf nehmen.

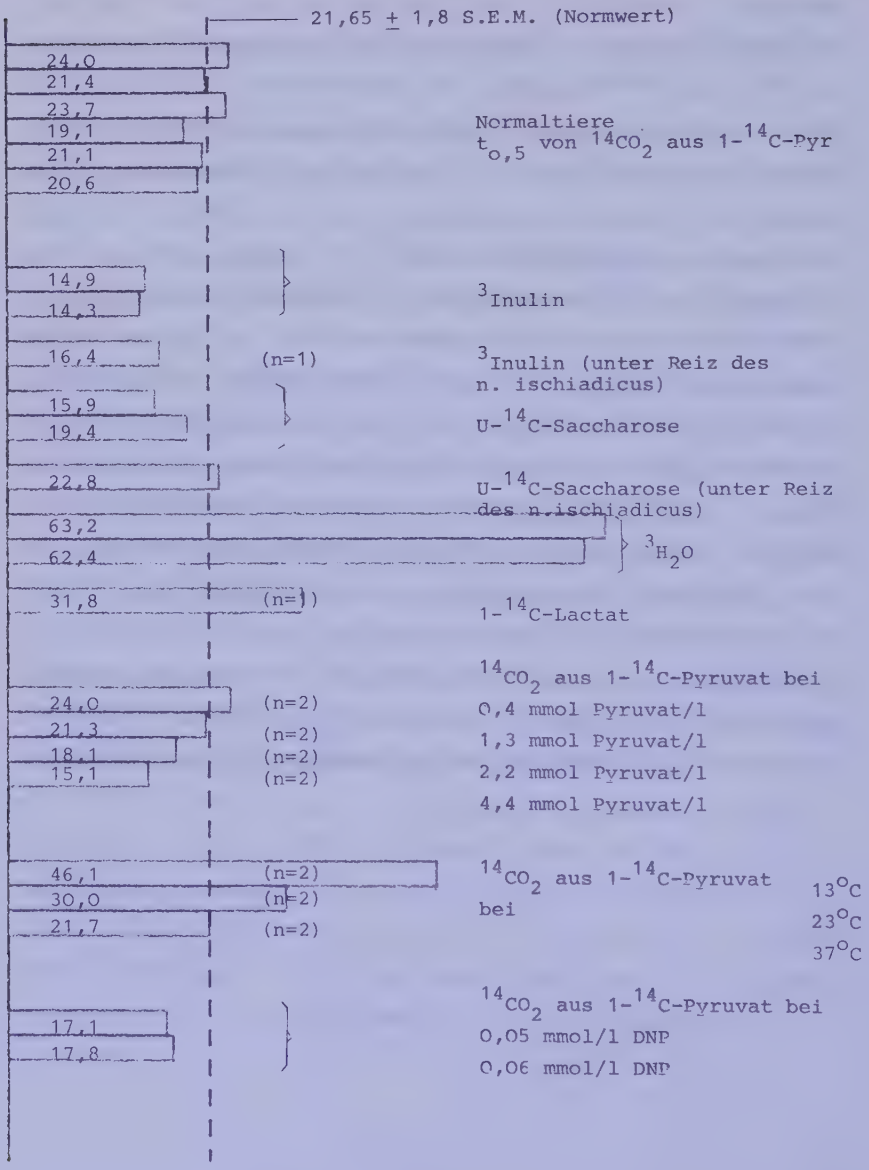
Obwohl mit optimierter enzymatischer Testmethodik eine Pyruvatcarboxylase-Aktivität (EC 2.8.1.40), die in der Leber vorhanden ist, im Muskel nicht nachgewiesen werden konnte (19),demonstrierten Spydevold et al am Herzmuskel den Einbau von $^{14}CO_2$ Citratcyclusintermediate bei Anwesenheit von Pyruvat und Malat (17). Die Folge einer solchen Pyruvatcarboxylierung zu Oxalacetat wäre eine entsprechende Verminderung der Pyruvatoxidation.

Somit läßt sich aus den Kurvenverläufen folgendes Reaktionsgeschehen ableiten: Nach Arbeitsbeginn wird vermehrt Pyruvat zu Oxalacetat carboxyliert. Für das Substrat Pyruvat bedeutet dies eine verminderte Decarboxylierung in der PDH-Reaktion, entsprechend einem Abfall der $^{14}CO_2$ Entwicklung aus 1-^{14}C-Pyruvat. Stattdessen fließt Pyruvat über eine Carboxylierungsreaktion als

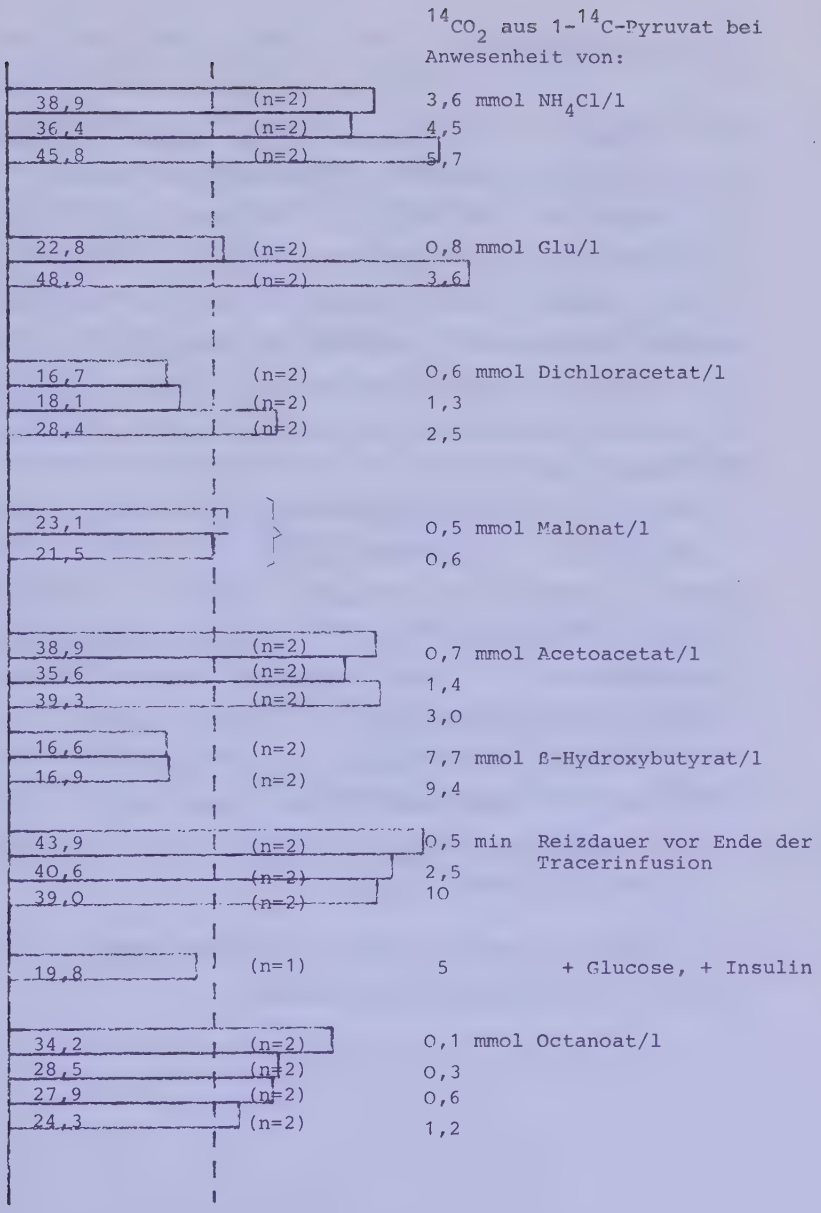
Oxalacetat vermehrt in den Citratcyclus und wird hier anschließend oxidiert, entsprechend einer vermehrten Freisetzung von $^{14}CO_2$ aus 3-^{14}C-Pyruvat. Ist genügend Carrier - im Bezug auf den energetischen Bedarf- für den Citratcyclus gebildet worden, fließt Pyruvat wieder über die PDH-Reaktion als Acetyl-CoA in den Cyclus.

Die gegebene Interpretation steht im Einklang mit den von Illingworth et al. am Herzmuskel gemessenen Konzentrationsänderungen von Citratcyclusintermediaten (37). Citrat und alpha-Ketoglutarat zeigen kurz nach Arbeitsbeginn einen Konzentrationsabfall. Die oben postulierte Pyruvatcarboxylierung zu Oxalacetat führt aufgrund der Gleichgewichtslage der Reaktion Malat zu Oxalacetat (G=30 kJ) zu der von Illingworth et al. gezeigten Malatbildung. Durch den kurzzeitig verminderten Einstrom von Acetyl-CoA aus Pyruvat fällt entsprechend die Citrat- und alpha-Ketoglutaratkonzentration ab. Nach Auffüllung des Citratcyclusses mit Oxalacetat kann die PDH-Reaktion vermehrt stattfinden. Dies äußert sich in dem Anstieg der $^{14}CO_2$-Entwicklung aus 1-^{14}C-Pyruvat, der dem beobachteten Abfall folgt.

3.5 Graphische Zusammenstellung der Ergebnisse



Zusammenstellung der $t_{0,5}$ (sec) der angegebenen Substanzen unter den aufgeführten Bedingungen


$^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat bei Anwesenheit von:
38,9 (n=2) 3,6 mmol NH_4Cl/l
36,4 (n=2) 4,5
45,8 (n=2) 5,7
22,8 (n=2) 0,8 mmol Glu/l
48,9 (n=2) 3,6
16,7 (n=2) 0,6 mmol Dichloracetat/l
18,1 (n=2) 1,3
28,4 (n=2) 2,5
23,1 0,5 mmol Malonat/l
21,5 0,6
38,9 (n=2) 0,7 mmol Acetoacetat/l
35,6 (n=2) 1,4
39,3 (n=2) 3,0
16,6 (n=2) 7,7 mmol ß-Hydroxybutyrat/l
16,9 (n=2) 9,4
43,9 (n=2) 0,5 min Reizdauer vor Ende der Tracerinfusion
40,6 (n=2) 2,5
39,0 (n=2) 10
19,8 (n=1) 5 + Glucose, + Insulin
34,2 (n=2) 0,1 mmol Octanoat/l
28,5 (n=2) 0,3
27,9 (n=2) 0,6
24,3 (n=2) 1,2

4. Zusammenfassung

Die Methodik der off-Kinetik Messung wurde am Modell des hämoglobinfrei perfundierten Rattenhinterkörpers erprobt.
Die Halbwertszeit von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat stellt dabei ein valides Maß für den Pyruvatdurchsatz durch den PDH-Komplex dar.
Unter Anwendung dieser Methode wurden die Einflüsse von Substratkonzentrationen, Temperatur und energetischem Zustand auf die Pyruvatdehydrogenase-Reaktion aufgezeigt sowie Effekte verschiedener Substrate auf den Komplex untersucht. Dabei zeigte sich weiter, daß:

- Acetoacetat die Pyruvatdecarboxylierung hemmt, während ß-Hydroxybutyrat sie stark steigert;
- der Einfluß von Octanoat auf die PDH-Reaktion konzentrationsabhängig ist, da geringe Konzentrationen den Pyruvatdurchsatz stark hemmen, während steigende Konzentrationen eine Rückkehr auf Normalwerte zeigen.
- mit geringen Konzentrationen von Dichloracetat die PDH aktiviert, mit hohen Konzentrationen jedoch inhibiert wird;
- durch Ammoniumionen und Glutaminsäure in hoher Konzentration die PDH inhibiert werden kann.

Die gefundenen Ergebnisse werden im Rahmen bekannter Untersuchungen mit gleicher Methodik diskutiert.

In Arbeitsversuchen wurde der Einfluß von Muskelarbeit auf die Pyruvatdecarboxylierung sowie der zeitliche Verlauf der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus 1-^{14}C-Pyruvat, 3-^{14}C-Pyruvat und U-^{14}C-Oleat unmittelbar nach Arbeitsbeginn untersucht. Die ermittelten Kurvenverläufe zeigen für 1-^{14}C-Pyruvat und 3-^{14}C-Pyruvat ein unterschiedliches Verhalten, das als anaplerotische Reaktion zur Auffüllung des Citratcyclus diskutiert wird. Hiermit wird ein weiterer Beitrag zur Frage einer Pyruvatcarboxylierung im Skelettmuskel erbracht.

Als Ergebnis dieser Arbeit wird die Anwendbarkeit der Methodik für die Bestimmung der Pyruvatoxidationsrate gesehen. Aus den erhobenen Meßwerten ist jedoch abzuschätzen, daß weniger eine Aktivierung erfaßt werden kann als eine Hemmung. Darüberhinaus erbrachten die unter Arbeitsbedingungen mit dieser Methodik erhobenen Befunde die Frage nach dem Geschehen unmittelbar nach Arbeitsbeginn. Hier wurden mit Messungen nach Einstellen des steady-state Daten erhoben, die auf einen kurzfristig ablaufenden Regulationsvorgang für die Pyruvatoxidation im Muskel schließen lassen.

5. Literaturverzeichnis

1. Hucho F. (1975)
   Angew. Chem. 87, 614-624

2. Linn TC, Pettit FH, Reed LJ (1968)
   Biochemistry 62, 234-241

3. Linn TC, Pettit FH, Hucho F, Reed LJ (1969)
   Biochemistry 64, 227-234

4. Coore HG, Field B (1974)
   Biochem.J. 142, 87-95

5. Wieland OH, Weiss L, Löffler G, Brunner I, Bard S
   in
   Regulation of Hep.Metab.Ed.F.Lundquist, Kopenhagen (1974)

6. Braun W (1976)
   Med. dent. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität zu München

7. Cohen PP
   in
   Manometric Techniques; ed. Umbreit WW, Burris RH, Stauffer JF
   Burgess Publ. Co., Minneapolis (1957), 147-150

8. Ruderman NB, Houghton CRS, Hems R (1971)
   Biochem.J. 124, 639-651

9. Villee CA, White VK, Haistings AB (1952)
   J.Biol.Chem. 195, 287-297

10. Garber AJ, Karl IE, Kipnis DM (1976)
    J.Biol.Chem. 251, 826-835

11. Hider EC, Fern EB, London DR (1971)
    Biochem.J. 121, 817-827

12. Odessy R, Goldberg AL (1972)
    Am.J.Physiol. 223, 1376-1383

13. Jefferson LS (1975)
    Methods Enzymol. 39, 73-82

14. Bondy PK (1949)
    Endocrinology 45, 605-608

15. Kühn-Velten N (1978)
    Med. Diss. Universität Düsseldorf

16. Caldwell MD, Lacy WW, Exton JH (1978)
J.Biol.Chem. 253, 6837-6844

17. Spydevold O, Davis EJ, Bremer J (1976)
Eur. J. Biochem. 71, 155-165

18. Segel IH: Enzyme Kinetics; John Wiley & Sons (1975)

19. Crabtree B, Higgins SJ, Newsholme EA (1972
Biochem. J. 130, 391-396

20. Häussinger D, Weiss L, Sies H (1975)
Eur.J.Biochem. 52, 421-431

21. Häussinger D, Gerok W, Sies H (1982)
Eur.J.Biochem. 126, 69-72

22. Wieland OH, Portenhauser R (1974)
Eur.J.Biochem. 45, 577-588

23. Whitehouse S, Cooper RH, Randle PJ (1974)
Biochem.J. 141, 761-774

24. Krebs HA, Johnson WA (1937)
Enzymologia 4, 148-156

25. Krebs HA (1975)
Perpect.Biol.Med. 14, 154-170

26. Lee SH, Davis EJ (1979)
J.Biol.Chem. 254, 420-430

27. Hagg SA, Taylor SI, Ruderman NB (1976)
Biochem.J. 158, 203-210

28. Scholz R, Olson MS, Schwab AJ, Schwabe U, Noell C, Braun W
(1978)
Eur.J.Biochem. 86, 519-530

29. Papa S, Francavilla A, Paradies G, Meduri B (1971)
FEBS Letters 12, 285-288

30. Papa S, Paradies G (1974)
Eur.J.Biochem. 49, 265-274

31. Wieland O, Funcke Hv, Löffler G (1971)
FEBS Letters 15, 295-298

32. Patzelt C, Löffler G, Wieland OH (1973)
Eur.J.Biochem. 33, 117-122

33. Wieland OH, Portenhauser R (1974)
Eur.J.Biochem. 45, 577-588

34. Portenhauser R, Wieland O (1972)
Eur.J.Biochem. 31, 308-314

35. Taylor SI, Mukherjee C, Jungas RL (1975)
J.Biol.Chem. 250, 2028-2035

36. Hennig G, Löffler G, Wieland OH (1975)
FEBS Letters 59, 142-145

37. Illingworth JA, Ford WCL, Kobayashi K, Williamson JR (1975)
Rec.Adv.Stud.Card.Struct.Metab. 8, 271-290

Herrn Professor Dr. W. Staib möchte an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und stete Anteilnahme am Fortgang der Arbeit und großzügige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Dr. M. Förster gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung der experimentellen Arbeiten sowie für anregende Diskussionen. Frau H. Ferrarini danke ich für ihre verläßliche Assistenz bei Rattenpräparationen.

Lebenslauf

11. 7. 1956	Geburt als Sohn des Eugen Nutz und seiner Ehefrau Klara, geb. Schaloske, in Krefeld
17. 4. 1963	Einschulung in die Overberg-Volksschule, Krefeld
7. 9. 1967	Schulwechsel auf die Albert-Schweitzer Schule (Städt. Realschule für Jungen), Krefeld
28. 5. 1973	Mittlere Reife
1. 8. 1973	Schulwechsel auf das Arndt-Gymnasium, Krefeld
31. 5. 1976	Zeugnis der Reife
1976 - 1982	Studium der Humanmedizin, Universität Düsseldorf
25. 8. 1978	Ärztliche Vorprüfung
14. 9. 1979	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
3. 9. 1981	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15. 10. 1982	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
8. 11. 1982	Approbation als Arzt
3. 1. 1983 - 31. 5. 1984	Wehrdienst und Anschlußwehrübung als Stabsarzt

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606